



Title	口腔粘膜における遅延型アレルギー反応モデル作製に関する研究
Author(s)	赤垣, 俊輔
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57591
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【6】

氏 名	あか 赤 がき 垣 しゅん 俊 すけ 輔
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 2 3 7 2 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 22 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学 位 論 文 名	口腔粘膜における遅延型アレルギー反応モデル作製に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 由良 義明 (副査) 教 授 川端 重忠 講 師 仲野 和彦 講 師 森本 佳成

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

口腔扁平苔癬は代表的な慢性炎症性の口腔粘膜疾患である。特にびらんや潰瘍を形成するものでは自覚症状が強い。扁平苔癬の原因として、歯科金属や薬剤に対する遅延型アレルギーが重要と考えられている。このような口腔粘膜疾患のメカニズムを解明して、治療法を開発するためには、病変を再現できる疾患モデルが必要であるが、理想的な系

が存在しない現状では、口腔での遅延型過敏反応(delayed type hypersensitivity; DTH)の実験系を開発し発展させることが現実的なアプローチである。

皮膚におけるアレルギー性疾患では、マウス耳介皮膚にハプテンとなる化学物質を塗布して接触皮膚炎を再現するモデルが確立しており、DTH は耳介の腫脹で測定される。口腔粘膜においても DTH の実験系がマウス頬粘膜で報告されているが、評価は組織学的検索によるものである。そこで、本研究では、DTH を肉眼的に継続して評価できる口腔粘膜の実験系を作製し、反応に関与する免疫担当細胞の同定とサイトカインの発現様式、さらに DTH に対する免疫抑制剤タクロリムスの影響を明らかにすることを目的として検討を行った。

【材料と方法】

1. マウス舌における DTH 実験系の作製:6 週齢の雌 Balb/c マウスを用い、体幹部皮膚にハプテンとなる 2, 4-dinitrochlorobenzene (DNCB) の 1%溶液を塗布して感作し、5 日後に 0.3%DNCB を左側舌縁に塗布し反応を惹起した。また、非感作群には DNCB 粘膜塗布のみを行った。経時的に舌厚径を計測し、舌腫脹率を求めた。免疫抑制剤タクロリムス軟膏の実験では、DNCB 粘膜塗布後、同じ粘膜面に 0.1%タクロリムス軟膏を塗布した。
2. 病理組織学的観察: 舌組織を切除して、ホルマリン固定後、組織標本を作成し H-E 染色を施した。粘膜に浸潤した細胞数を顕微鏡下に算定し、数値化した。
3. 免疫組織化学染色: 摘出した組織から切片を作製し、T 細胞マーカーである CD4, CD8 ならびに、制御性 T 細胞マーカーである CD25, Foxp3 を免疫組織化学染色で検出し、浸潤細胞におけるこれら T 細胞の割合を算定した。
4. reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR): 舌組織より抽出した RNA を用い、IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- γ , granzyme B, β -actin に対するプライマーを設定して、mRNA を RT-PCR で検出した。

【結果】

1. DNCB による皮膚感作後、DNCB 粘膜塗布で反応を惹起し、舌厚径を経時的に測定した。12 時間から増大がみられて 24 時間で最大となり、72 時間までしだいに減少した。非感作群でも 12 時間から舌腫脹はみられたが、24 時間での腫脹率は感作群よりも低く、それ以降、感作群との差はしだいに大きくなった。
2. 舌粘膜組織像を経時的に観察した結果、反応惹起後 24 時間で炎症細胞浸潤ならびに血管の拡張が顕著となった。
3. 粘膜へ浸潤する細胞について、CD4 と CD8 に対する免疫組織化学染色を行ったところ、CD8⁺細胞は 48 時間にピークがあり、その後は減少した。これに対して、CD4⁺細胞は、持続して増加がみられ、制御性 T 細胞で発現する CD25 あるいは Foxp3 を発現する細胞も 72 時間まで増加した。

4. サイトカインならびに granzyme B の遺伝子発現について、舌組織の RNA を用いて RT-PCR を行った。IL-1 β , granzyme B で発現が誘導され、IL-6, IL-10, TNF- α , IL-12 発現の増大がみられた。
5. 舌に対して DNCB 粘膜塗布後にタクロリムス軟膏を塗布して、その効果を舌腫脹で検討したところ、薬剤を塗布した群では、基剤塗布の対照群と比較して舌の腫脹率が低下した。
6. 粘膜浸潤細胞に対する免疫組織化学染色の結果、タクロリムス群では対照と比較して浸潤細胞に対する CD8⁺細胞の割合が低下し、CD4⁺細胞は増加した。
7. RT-PCR による解析で、タクロリムスを塗布した群では、対照と比較して、IL-2, TNF- α , granzyme B の発現が低下した。

【考察と結論】

本研究では、感作動物の舌に DNCB 塗布で反応を惹起し、舌厚径を測定したところ、24 時間をピークとして舌は腫脹し、その後は徐々に消退した。非感作動物でも軽度の腫脹を伴う一次刺激性反応をきたすが、DTH としては 24 時間以降の所見が重要と考えられた。DNCB 粘膜塗布 48 時間で CD8⁺細胞の浸潤がピークとなり、CD4⁺細胞も増加することから、これらの T 細胞が DTH の惹起では必須の因子といえる。CD25, Foxp3 陽性の制御性 T 細胞は持続して増加し、DTH の終息に働くと思われる。タクロリムス軟膏塗布は舌腫脹を抑制するが、これには CD8⁺細胞の抑制、CD4⁺細胞の増加、IL-2, TNF- α , granzyme B の発現抑制が関与すると考えられた。以上より、本実験系は同一個体で継続して肉眼的な観察ができ、DTH に対する治療薬の効果を研究する上でも有用であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究はマウス舌粘膜で遅延型過敏反応の実験系を作製し、免疫抑制剤タクロリムスの効果について検討したものである。

その結果、遅延型過敏反応には CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞、制御性 T 細胞が関与しており、タクロリムスが反応を強く抑制することが明らかとなった。

以上の結果は、口腔粘膜疾患の病態の解明と治療法の発展に重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。